

THESIS

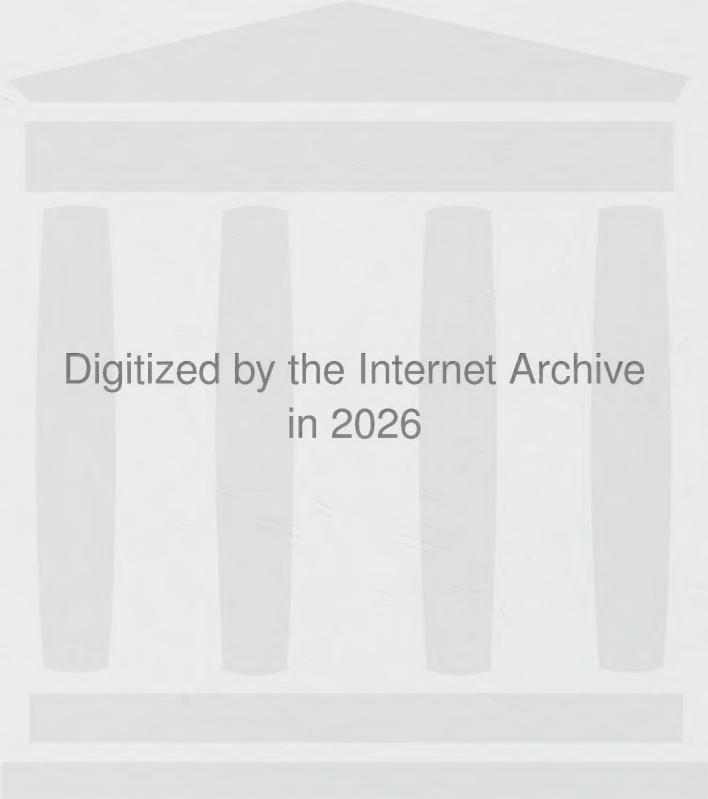
MUNICH

1965

ISOLIERUNG UND
CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON
PEPSITENSIN

Hans-Friedrich Scheller

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153516_0005

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der
Chirurgischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Isolierung und chemische Charakterisierung
von
P E P S I N

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Friedrich Scheller
aus Geislingen/Steige

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.XII.1965

MEINER MUTTER
UND DEM ANDENKEN
MEINES VATERS

I N H A L T

I)	Einleitung	Seite	1
II)	Theoretischer Teil		5
1)	Anreicherung und Reindarstellung von Pepsitensin		
2)	Chemische Untersuchungen		12
3)	Pharmakologische Untersuchungen		13
4)	Diskussion der Ergebnisse		18
III)	Experimenteller Teil		22
1)	Anreicherung und chemische Untersuchungen		
2)	Pharmakologische Untersuchungen		27
3)	Abbauversuche		27
IV)	Zusammenfassung		28
V)	Literaturverzeichnis		30

Einleitung

Verschiedene Untersuchungsrichtungen von Physiologie, Pharmakologie und Pathologie, die seit einigen Jahrzehnten gepflegt werden, führten zur Auffindung einer großen Anzahl körpereigener, pharmakologisch äußerst aktiver Substanzen, deren Natur als Eiweißkörper oder langkettige Polypeptide aufgeklärt werden konnte. In einer Reihe von Fällen wurde die Aminosäuresequenz aufgeklärt und einige der Substanzen sogar synthetisiert. Es sei auf das für die Blutzuckerregulierung verantwortliche Pankreashormon Insulin, die Corticotropine, das Melanozytenstimulierende Hormon und die Hormone des Hypophysenhinterlappens Oxytocin und Vasopressin hingewiesen.

Eine Reihe von stark wirksamen Pilzgiften und eine eigene Gruppe von Antibiotika besitzen ebenfalls einen peptidartigen Aufbau.

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß der Blutdruck der verschiedensten höheren Organismen durch Spuren stark wirksamer körpereigener Substanzen erhöht oder gesenkt werden kann. Diese Substanzen wurden, da über ihre chemische Zusammensetzung wenig bekannt war, unter dem Sammelbegriff für verschiedenartige pharmakologische Wirkstoffe den Gewebshormonen zugeordnet.

So wurde zunächst von Frey, Kraut und Werle 1937 (1) aus verschiedenen Organen ein stark blutdrucksenkendes Prinzip isoliert, nach seinem hauptsächlichsten Vorkommen im Pankreas als Kallikrein (Kallikreas, griech. = Bauchspeicheldrüse) bezeichnet und ursprünglich als kreislaufaktives Hormon betrachtet. Erst bei näherer Untersuchung und mit dem Fortschreiten der Entwicklung der Eiweiß- und Peptidchemie wurde nachgewiesen,

daß es sich bei Kallikrein nicht um das auf die Rezeptoren der Blutdruckregulierung wirksame Prinzip handelt.

Es wurde gezeigt, daß Kallikrein nur in Verbindung mit Plasma biologische Wirkung erlangt. Bei den direkten Untersuchungen am Kreislauf von verschiedenen Tieren war diese Voraussetzung gegeben. Isolierte Organe wie Uterus, Ileum oder Carotisstreifen reagierten nicht auf Kallikrein allein.

Da Kallikrein durch Hitze inaktiviert wird und es nicht dialysierbar ist, wurde auf einen relativ hochmolekularen Eweißkörper geschlossen. Kallikrein wird durch Blutplasma langsam inaktiviert. Beim Studium der Kinetik dieser Inaktivierung beobachtete Werle (2, 3), daß kurz nach dem Mischen von Plasma mit Kallikrein eine stark darmkontrahierende Wirkung auftritt und nach einiger Zeit wieder verschwindet. Das wirksame Prinzip war dialysierbar und damit niedermolekular und durch Kochen nicht denaturierbar. Der weitere Verlauf der Untersuchungen führte dann zur Reindarstellung der Verbindung und deren Strukturaufklärung durch Werle und Trautschold. Die als Kallidin bezeichnete Substanz wurde als Polypeptid, bestehend aus 10 Aminosäuren, erkannt.

Damit war nachgewiesen, daß dem Kallikrein proteolytische Wirkung zukommt, wobei als Substrat ein α_2 -Globulin des Blutplasmas fungiert und als Reaktionsprodukt das hochwirksame Polypeptid Kallidin abgespalten wird, mit anderen Worten, daß das Kallikrein ein spezifisches proteolytisches Enzym darstellt.

Etwa 10 Jahre später wurde von Roche e Silva (4) eine ähnliche Wirkung wie beim Kallikrein für die gut untersuchte Protease Trypsin und einige trypsinähnliche Schlangengiftenzyme gefunden. Die systematische Untersuchung dieses Problems

führt ebenfalls zur Isolierung eines niedermolekularen Peptids aus den mit Trypsin inkubierten Plasmaproben. Die Reindarstellung, Strukturaufklärung (5) und Totalsynthese (6) ergab das Vorliegen eines Nonapeptids mit der gleichen Grundstruktur wie Kallidin, welches sich nur durch das Fehlen der Aminosäure Lysin am Aminoende des Peptids unterscheidet.

Eine ähnliche historische Entwicklung kann für ein hochdruckerzeugendes Prinzip des Organismus aufgezeigt werden. Bereits um die Jahrhundertwende wurde gefunden, daß die intravenöse Verabfolgung von Nierenextrakten eine lang anhaltende Blutdrucksteigerung bewirkt. Das wirksame Prinzip wurde als Hormon unter der Bezeichnung Renin klassifiziert. Wie am Beispiel des Kallikreins gezeigt, wurde bald nach der Feststellung der Enzymnatur des Kallikreins gefunden, daß auch das Renin nicht das eigentlich pharmakologische Prinzip darstellt, sondern daß offensichtlich ebenfalls in einem proteolytischen Vorgang das Wirkungsprinzip freigelegt wird.

Die genaue Analyse der Vorgänge zeigte, daß Renin aus einem α_2 -Globulin des Serums ein Dekapeptid, das Angiotensin I, freilegt, das, pharmakologisch inaktiv, durch ein Enzym des Plasmas das sogenannte "converting enzyme" in das eigentlich wirksame Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt wird.

Bei Untersuchungen über die durch die Einwirkung der oben beschriebenen Enzyme auf Blutplasma oder α_2 -Globuline freilegbaren, die glatte Muskulatur erregenden Peptide, fand Croxatto (7), daß auch Pepsin die relativ unspezifische, unter physiologischen Verhältnissen im Plasma nicht zur Wirkung gelangende Protease des Magens, ebenfalls aus Blutplasma pharmakologisch wirksame Stoffe freizulegen vermag.

Croxatto konnte nach Inkubation von Blutplasma mit Pepsin

im Gemisch der Spaltprodukte eine, die glatte Muskulatur erregende Wirkung nachweisen. Die pharmakologische Analyse zeigte das Vorliegen eines blutdrucksteigernden Prinzips, das die Bezeichnung Pepsitensin erhielt.

Aus der Wirkungsweise des Pepsins als Endopeptidase konnte geschlossen werden, daß das aktive freigelegte Prinzip mit den bisher besprochenen Polypeptiden nicht identisch ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das blutdrucksteigernde Peptid Pepsitensin

- 1) rein darzustellen, auf seine chemische Zusammensetzung hin zu untersuchen und es
- 2) gegen die bereits bekannten aktiven Polypeptide pharmakologisch abzugrenzen.

II. Theoretischer Teil

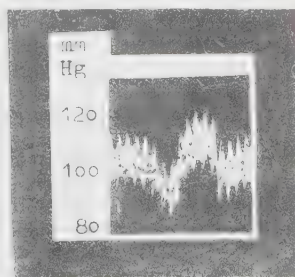
1) Anreicherung und Reindarstellung von Pepsitensin.

Da aus verschiedenen Beobachtungen bekannt war, daß in angesäuertem Serum oder Plasma eine Reihe von Proenzymen in ihre aktive Form übergehen, die ihrerseits die Freilegung verschiedener pharmakologisch wirksamer Substanzen bewirken können, und daß ähnliche Vorgänge bereits durch Kontakt von Serum oder Plasma mit benetzbaren Oberflächen wie etwa Glas in Gang kommen können, wurde zur Zerstörung dieser Enzyme zunächst das als Ausgangsmaterial dienende Rinderplasma durch Fällung mit Perchlorsäure inaktiviert.

Nach Entfernung der Perchlorsäure durch Dialyse diente das so denaturierte Eiweiß als Substrat für die Inkubierung mit Pepsin. Für die Spaltbedingungen wurde ein pH von 2,5, eine Spaltdauer von 40 Stunden bei 37°C. und eine Enzymmenge von 1:1000 auf Protein berechnet gewählt, wobei die gleiche Enzymmenge nach dem Nachstellen des pH nochmals zugegeben wurde.

Bei der i.v.-Injektion des so gewonnenen Spaltgemisches beobachtet man am Blutdruck des Hundes zunächst eine starke Blutdrucksenkung und nach deren Abklingen eine Blutdrucksteigerung (s. Abb. 1).

Abb. 1 Carotisblutdruck eines 12 kg schweren mit Morphin/Pernocton narkot. Hundes. Blutdruckänderung nach i.v.-Injektion von 2 ml Spaltgemisch.



Die Wirkung kann einerseits dem Pepsitocin, andererseits dem Pepsitensin zugeschrieben werden.

Für weitere Untersuchungen ergab sich zunächst das Problem, beide Substanzen im Spaltansatz zu trennen. Es zeigte sich, daß durch Fällung mit Perchlorsäure noch ein großer Teil von inaktivem Material entfernt werden kann. Die Verdauung mit Pepsin führt im Gegensatz zu den beiden anderen Endopeptidasen Trypsin und Chymotrypsin überwiegend zu noch relativ hochmolekularen Peptiden. Der niedermolekulare Anteil der peptischen Peptide wurde in Vorversuchen nach der Methode von Braunitzer (c) am stark basischen Ionenaustauscher Dowex 1 x 2 grob fraktioniert, wobei eine Trennung in basische, neutrale, schwach und stark saure Peptide erreicht wird.

Austritt aus der Säule bei pH 8,4 = Fraktion D₁, pH 6,5 = Fraktion D₂, pH 4,0 = Fraktion D₃ und pH 3,5 = Fraktion D₄. (siehe Fig. 1)

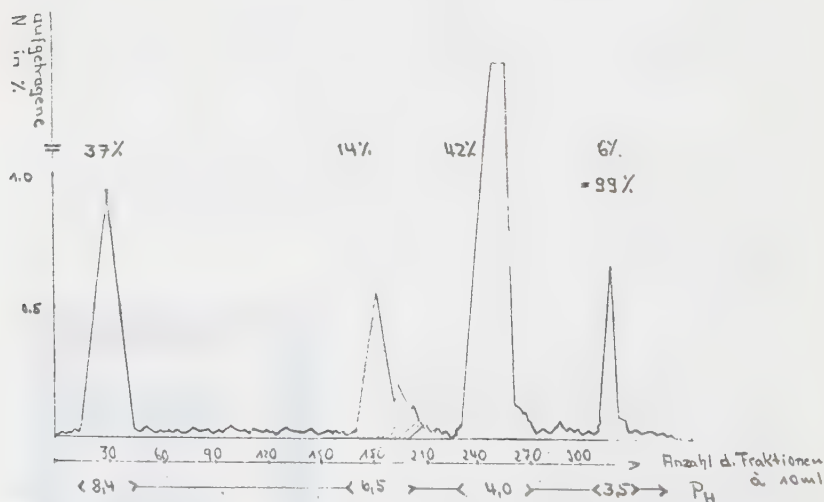


Fig. 1 Fraktionierung der nach Pepsitensinverdauung anfallenden Peptide an Dowex 1 x 2. Pepsitensin findet sich im schraffierten Bereich.

Die biologische Untersuchung der Fraktionen ergab, daß die gesamte blutdrucksenkende Aktivität auf die Fraktion der basischen Peptide (D_1) lokalisiert ist. Damit gehört das Pepsotocin mit einiger Wahrscheinlichkeit zur Gruppe der Kinine, also zu Methionyl-Kallidin, Kallidin und Bradykinin. Die pressorische Wirkung findet sich völlig frei von überlagerten anderen Wirkungen in der Gruppe der neutralen Peptide (D_2). Die beiden sauren Fraktionen enthalten keine aktiven Substanzen.

Diese Eigenschaft des Pepsitensins wurde nun bei der Aufarbeitung größerer Plasmamengen zu seiner Anreicherung ausgenutzt. Es genügt das mehrmalige Behandeln der Spaltansätze mit Dowex 1 x 2 in der OH-Form bei pH 8,4, um das gesamte gebildete Pepsitensin zu adsorbieren. Nach dem Waschen des Austauschers mit Puffer von pH 8,9 kann das Pepsitensin mit 0,2n Essigsäure wieder quantitativ desorbiert werden. Zur weiteren Verarbeitung wird dieser Extrakt nochmals säulenchromatographisch über Dowex 1 x 2 getrennt, um mitgeschleppte basische und saure Peptide vollständig zu entfernen.

Alle bisher bekannten ähnlich wirkenden Polypeptide besitzen im Durchschnitt ein Molekulargewicht um 1000. Es konnte angenommen werden, daß im vorliegenden Fall die Verhältnisse ähnlich liegen, wodurch eine Fraktionierung an Dextran nach Molekülgröße sinnvoll erschien. An-Sephadex G 25, bei dem ein Ausschluß von Molekülen mit Molekulargewichten über 5000 stattfindet, wurde zunächst eine Abtrennung der Begleitpeptide mit Molekulargewichten über 5000 erreicht (s. Fig. 2).

Die biologische Aktivität wird erst sehr spät, kurz vor den anorganischen Salzen eluiert, so daß auch die Abtrennung kleinerer Peptide gelingt.

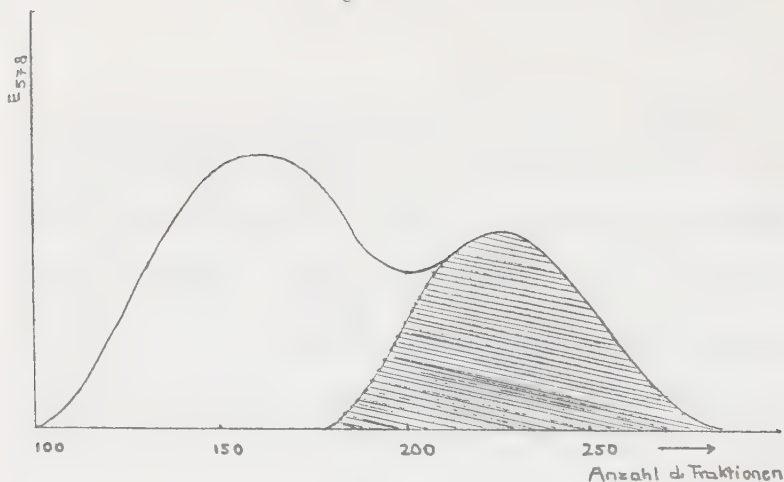


Fig. 2 Fraktionierung an Sephadex G 25 (Säulenlänge 90 cm, Durchmesser 8 cm), Fraktionen zu 10 ml. Schraffierte Fläche enthält aktives Material.

Durch zweimalige Wiederholung dieses Vorgangs wird bereits ein Peptidgemisch mit relativ einheitlichem Molekulargewicht und hoher Aktivität gewonnen.

Aus diesem Verhalten konnte bereits geschlossen werden, daß das Molekulargewicht des Pepsitensins ungefähr bei 1000 liegt. Zur weiteren Anreicherung des gesuchten Peptids stand die Anwendung von Kationenaustauschern zur Wahl. Kationenaustauscher auf Polystyrolbasis waren ungeeignet, da sie ein erhebliches Retentionsvermögen für Pepsitensin zeigten. Wie die später durchgeführte Analyse ergab, war dieses durch den Gehalt an den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin bedingt.

Die Austauscher auf Cellulosebasis wie CM- und SE-Cellulose zeigten keine Affinität zu Pepsitensin. An der aus relativ stark sauren Phosphatgruppen bestehenden P-Cellulose gelingt bei pH 3,0 Absorption des Pepsitensins, während ein großer Anteil inaktiver Peptide den Austauscher ohne Bindung verlassen. Die Desorption des pepsitensinhaltigen Gemisches gelingt

mit 0,1n Ammoniak (s. Fig. 3).

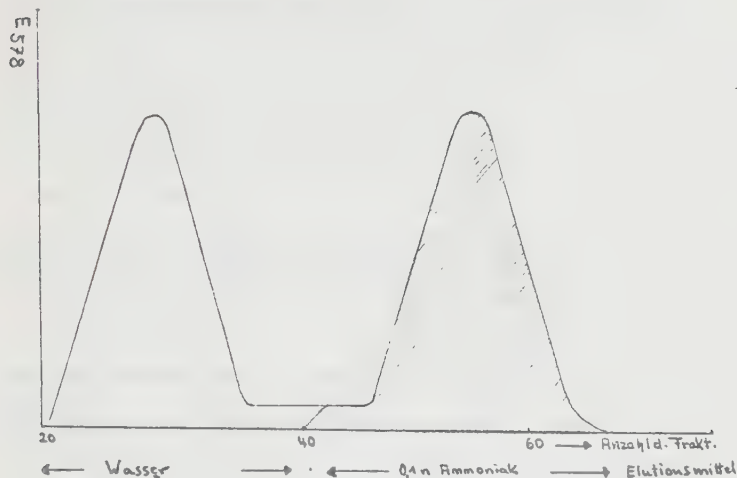


Fig. 3 Fraktionierung an P-Cellulose (Säulenlänge 60 cm, Durchmesser 6 cm), Fraktionen zu 10 ml. Schraffierte Fläche enthält aktives Material.

Diese Verhaltensweise läßt bereits auf ein geringes Überwiegen basischer Gruppen im Molekül des Pepsitensins schließen.

Nach der so erzielten Anreicherung auf Grund reiner Ladungseigenschaften und auf Grund der schwachen Ladung des Pepsitensins war eine weitere Reinigung des Präparates mittels Elektrophorese nicht zu erwarten und gelang auch nicht in befriedigender Weise.

Durch Verteilungschromatographie in Form der Papierchromatographie wurde die weitere Reinigung versucht. In Vorversuchen wurde als günstigste mobile Phase wassergesättigtes Colloidin ermittelt, wobei eine verhältnismäßig große Verteilung über den ganzen Trennbogen erreicht wird. In präparativem Maßstab wurde auf großen Papierbögen das Substanzgemisch strich-

förmig aufgetragen. Die Lokalisation der einzelnen Peptide erfolgte durch Entwickeln von Randstreifen mit Ninhydrin. Die so festgelegten peptidhaltigen Zonen wurden ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und in den Eluatn auf blutdrucksteigernde Wirkung untersucht. Nach der so erhaltenen Fixierung der pressorisches Material enthaltenen Zone wurde nach dem gleichen Verfahren eine größere Menge Substanzgemisch aufgearbeitet.

Durch zweimalige Rechromatographie mit demselben Laufmittel wurde eine einheitliche Zone erhalten. Die Prüfung auf Einheitlichkeit mit Butanol-Ameisensäure-Wassergemisch zeigte das Vorliegen von drei verschiedenen Peptiden. Die Zuordnung der blutdrucksteigernden Wirkung gelang nach der gleichen wie oben beschriebenen Technik.

Eine weitere Prüfung auf Einheitlichkeit mit den Laufmitteln Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5), beziehungsweise Pyridin-Butanol-Essigsäure-Wasser (10:15:3:12) ergab keine Aufspaltung in ninhydrinpositive Substanzen.

Eine Zusammenstellung der verschiedenen Reinigungsschritte mit Angabe der pharmakologischen Aktivität der einzelnen Präparate findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1

Isolierung von Pepsitensin aus 50 l Rinderplasma nach
Pepsinverdauung. (Eine Pepsitensineinheit = 1Pi definiert
als wirkungsgleich mit 1 ug synthetischem 5-valyl-Angio-
tensin II)

Trennungs- methode	Peptide in g	Einheiten	Aktivität mg Peptid pro Pi	Anreiche- rung x-fach	Aus- beute in %
Pepsinver- dauung	3500	18000	200	-	-
Dowex 1 x 2	1058	15500	67	3	86
Sephadex G 25	12,3	12300	1	200	68
Papier- chromato- graphie 1	0,3	6000	0,05	4000	32
Papier- chromato- graphie 2	0,006	3000	0,002	10000	16

2) Chemische Untersuchungen

Bei dieser Stufe der Reinigung und erzielten Anreicherung (Tabelle 1) konnte bereits auf das Vorliegen einer einheitlichen Substanz geschlossen werden und es wurde die Endgruppenbestimmung nach Sanger mit Hilfe der Dinitrophenylierung (9) vorgenommen.

Nach Hydrolyse des DNP-Peptids zeigte die papierchromatographische Untersuchung des Ätherauszuges neben den Artefakten Dinitroanilin und Dinitrophenol eine DNP-Aminosäure, welche als Di-DNP-Lysin identifiziert werden konnte. In der wäßrigen Phase wurden keine dinitrophenylierten Derivate gefunden. Die Einheitlichkeit des gewonnenen Peptids war damit nachgewiesen. Die restliche gewonnene Substanz wurde nun der Totalhydrolyse unterworfen und die Aminosäurezusammensetzung des Pepsitensins nach der Methode von Stein und Moore (10) in der Anordnung von Hannig (11) bestimmt.

Die Auswertung des Diagramms zeigte das Vorhandensein der Aminosäuren Lysin, Histidin, Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Glycin, Alanin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin in den Molverhältnissen 1,00; 0,97; 1,08; 1,15; 1,00; 0,5; 1,02; 0,82; 0,95; 1,03; 0,99.

Bei Berücksichtigung des niedrigen Wertes für Prolin, der auf die geringe Extinktion der Ninhydrinfärbung zurückzuführen ist, kann für Pepsitensin die vorläufige Teilformel angegeben werden: Lys (His, Asp, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Leu, Tyr, Phe). Für die weitere Untersuchung, die Gewinnung tryptischer oder chymotryptischer Spaltprodukte oder die Bestimmung der carboxylständigen Aminosäure stand keine Substanz mehr zur Verfügung.

3) Pharmakologische Untersuchungen

Die Angiotensine gehören zu den wirksamsten vasokonstriktorisch und damit blutdrucksteigernden Stoffen. Der Angriffspunkt für diese Polypeptide, zu denen auch das Pepsitensin zu rechnen ist, ist die glatte Muskelfaser der Gefäßwand.

Die blutdrucksteigernde Wirkung kann daher an geeigneten isolierten Präparaten wie Uterus, Carotis und Ileum der gebräuchlichen Versuchstiere nachgewiesen werden. Eine Besonderheit als Testobjekt stellt der isolierte Carotisstreifen dar, da an ihm nur Octapeptide (Peptide, deren Molekül aus 8 Aminosäuren besteht) zur Wirkung gelangen.

Am narkotisierten Hund ändern sich nach intravenöser Verabfolgung von synthetischem Angiotensin II oder Pepsitensin verschiedene Kreislaufgrößen als Folge der peripheren Vasokonstriktion und der Erhöhung des peripheren arteriellen Widerstandes.

So kommt es dabei zu einem Anstieg des systolischen und diastolischen Druckes, wobei häufig nach Injektion von Pepsitensin eine Vergrößerung der Blutdruckamplitude beobachtet werden kann. Ein Ansteigen der Diurese dürfte eine Folge der Blutdrucksteigerung darstellen.

Außer an der Erregung der glatten Gefäßmuskulzelle kann die pharmakologische Wirksamkeit von Angiotensin und Pepsitensin an überlebenden Organen bzw. Organteilen wie Rattenuterus und Meerschweinchenileum geprüft werden.

Die Blutdrucksteigerung nach Injektion von Angiotensinen hält infolge des raschen enzymatischen Abbaus dieser Polypeptide nur kurzfristig an. Die Ansprechbarkeit des Kreislaufs auf wiederholte Injektionen von pressorisch wirkenden Substanzen bleibt bei Verwendung kleiner Angiotensin- bzw. Pepsitensin-

mengen nahezu konstant.

Die Injektion des freilegenden Enzyms, z. B. Renin, verursacht eine lang anhaltende Vasokonstriktion. Die Reinjektion in kurzem Zeitabstand führt rasch zu einer Abnahme der Empfindlichkeit und zum Auftreten einer Tachyphylaxie. Wie zu erwarten bleibt eine Injektion von Pepsin bei der absoluten Reaktion des Blutes (pH 7,4) ohne Wirkung auf den Kreislauf des Versuchstieres.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde zur Überprüfung der Anreicherung von Pepsitensinpräparaten die Blutdrucksteigerung am narkotisierten Hund (Technik siehe Experimenteller Teil) aufgezeichnet und mit der Wirkung von 5-valyl-Angiotensin II verglichen.

An Hand dieser Blutdruckkurven konnte die unterschiedliche Beeinflussung des Kreislaufs des Versuchstieres durch die beiden pressorisch wirkenden Substanzen beobachtet werden.

Werden von beiden Substanzen Mengen injiziert, die den gleichen Blutdruckanstieg zur Folge haben, so fällt auf, daß mit synthetischem Angiotensin sehr rasch ein kurzfristiges Blutdruckmaximum erreicht wird, das in relativ kurzer Zeit kontinuierlich auf den Ausgangswert zurückkehrt, während mit Pepsitensin das gleiche Maximum länger anhält und vergleichsweise langsam auf den Ausgangswert abfällt (s. Abb. 2).

In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Croxatto, der zeigen konnte, daß Pepsitensin von Extrakten aus hämolysierten Erythrozyten, Niere und Leber, die besonders reich an Angiotensinase sind, weniger schnell abgebaut wird wie Angiotensin II, findet sich offensichtlich auch in vivo eine verzögerte Pepsitensininaktivierung.

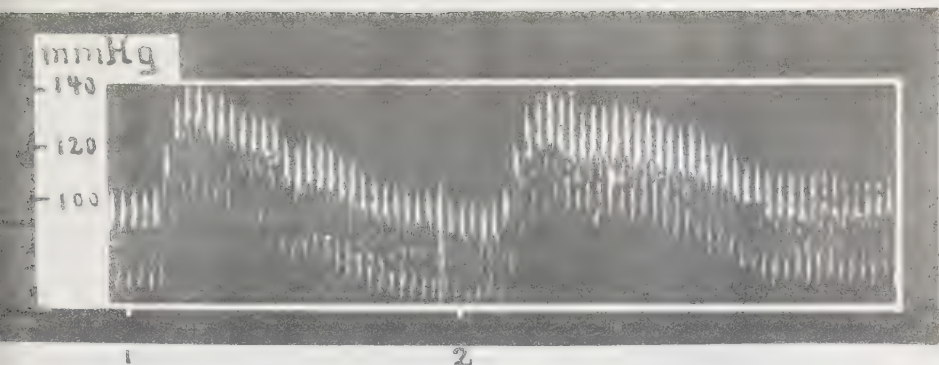


Abb. 2 Carotisblutdruck eines 16 kg schweren mit Morphin/Pernocton narkotisierten Hundes. Blutdruckveränderung nach i.v.-Injektion von 1=0,4 ug Angiotensin II und 2=0,8 ug Pepsitensin.

Bei Überprüfung der Beständigkeit des Pepsitensins durch Inkubation mit den proteolytischen Fermenten Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Carboxypeptidase ergab sich, daß nach 30 Minuten Pepsitensin durch die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidase zu pharmakologisch unwirksamen Substanzen abgebaut wird, während bei Inkubation mit Pepsin nach der gleichen Zeit eine Restaktivität von 50% gefunden wird.

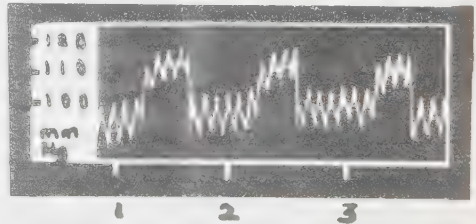
Inkubation von Pepsitensin mit Plasma in vitro führt nach 4 Stunden noch zu keiner feststellbaren Inaktivierung. Demnach vollzieht sich der Abbau von Pepsitensin anscheinend in bestimmten Organen, da die Peptidasen des Serums gegenüber Pepsitensin nahezu unwirksam sind. Auch hieraus ergibt sich die Verschiedenheit von Pepsitensin und Angiotensin, da letzteres durch Serum verhältnismäßig rasch inaktiviert wird.

Bei Untersuchungen an anderen Testobjekten ergab sich für die pharmakologische Wirksamkeit von Pepsitensin ein signifikanter Unterschied gegenüber Angiotensin II. Die am Blutdruck des Hundes pressorisch wirkenden Polypeptide zeigen am Rattenuterus und Meerschweinchenileum eine kontraktionserregende Wirkung.

Die Verabfolgung von Angiotensin bzw. Pepsitensin löst am Rattenuterus eine Kontraktion aus, nach deren Erschlaffung sich eine zweite anschließt, während das Meerschweinchenileum diesen Reiz mit einer einmaligen Kontraktion beantwortet.

Zur Bestimmung des Diskriminierungsfaktors wurde zunächst am Carotisblutdruck des Hundes die einer definierten Angiotensinmenge wirkungsgleiche Pepsitensinmenge ermittelt (s. Abb. 3) und auf ihre Wirksamkeit an den genannten Testobjekten untersucht.

Abb. 3 Carotis-
blutdruck eines
12 kg schweren mit
Morphin/Pernocton
narkotisierten Hundes.
Intravenöse Injektion:



1 = 0,4 ug Angiotensin II, 2 = 0,7 ug Pepsitensin, 3 = 0,3 ug Angiotensin II.

Dabei fand sich am Rattenuterus eine Wirkung des Pepsitensins, die nur 20% der des Angiotensins II entspricht. Die gleichen Untersuchungen am Meerschweinchenileum ergeben für Pepsitensin nur 25% der Wirkung von Angiotensin II. (s. Abb. 4 und 5).

Abb. 4 Kontraktionen des isolierten Rattenuterus in Tyrodelösung (20 ml, 30°C.) durch Zugabe von
1 = 0,03 ug Angiotensin II
2 = 0,35 ug Pepsitensin.
Der Vergleich auf molarer Basis ergibt, daß Pepsitensin am Rattenuterus fünfmal weniger wirksam ist als Angiotensin II.

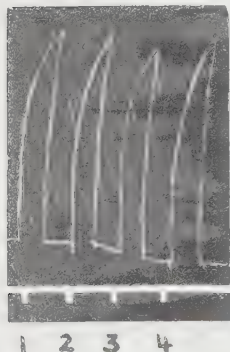


Abb. 5 Kontraktionen des Meerschweinchenileums in Jalonlösung (20 ml, 30°C.) durch Zugabe von
1 und 3 = 0,03 ug Angiotensin II
2 und 4 = 0,28 ug Pepsitensin.
Am Meerschweinchenileum ist Pepsitensin verglichen auf molarer Basis viermal weniger wirksam als Angiotensin II.

Zur Prüfung der Frage, ob das Endekapeptid Pepsitensin durch Renin unter Entwicklung von Angiotensin angegriffen ist, wurde weitgehend gereinigtes Pepsitensin mit hochwirksamem Isorenin (12) versetzt und 10 Minuten bei 37°C. inkubiert.

Nach der Inkubation wurde ein Ansatz ohne Renin und der Ansatz mit Renin 5 Minuten gekocht und die pharmakologische Wirksamkeit beider Lösungen am Blutdruck des Hundes untersucht.

Der biologische Test ergab keine pharmakologische Wirksamkeitsänderung für die mit Renin inkubierte Pepsitensinmenge, so daß geschlossen werden kann, daß durch Renin aus Pepsitensin Angiotensin nicht gebildet wird.

4) Diskussion der Ergebnisse

Da außer Angiotensinen aus verschiedenen Seren bisher kein ähnliches wirksames Polypeptid mit ähnlicher Struktur wie Pferde- oder Rinderangiotensin, welches sich nur in der Aminosäureposition 5 (Ileu bzw. Val) unterscheiden, bekannt geworden ist, stellt sich bei der Diskussion des isolierten Pepsitensins die Frage, ob es sich um ein völlig neues Wirkungsprinzip handelt, oder ob in ihm die spezifischen Konstitutionsmerkmale, welche für die pressorische Wirkung verantwortlich sind, latent enthalten sind.

Die erste Frage ist erst nach vollständiger Konstitutionsaufklärung zu beantworten, während die zweite Frage bei Vergleich der Bausteinanalyse mit bisher vorliegenden Forschungsergebnissen einer Diskussion zugänglich ist.

Die systematische Untersuchung des Wirkungsprinzips der synthetischen Angiotensine, welche darauf beruht, die einzelnen Aminosäuren der Polypeptidkette systematisch gegen andere zu ersetzen und die dabei auftretenden Aktivitätsänderungen zu bestimmen, zeigen deutlich, daß bei Ersatz der einen oder anderer Aminosäuren durch andere, durchaus noch Substanzen mit zum Teil beachtlicher pressorischer Restaktivität entstehen.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht der näher untersuchten Octapeptide vom Angiotensin-Typ, welche synthetisch zugänglich sind und deren pharmakologische Eigenschaften näher untersucht sind.

Am Ende der Tabelle sind die Aminosäuren des Pepsitensins in den entsprechenden Positionen des Angiotensins II eingetragen. Dabei zeigt sich, daß die Aminosäuren, die für die Aktivität wesentlich sind, im Pepsitensinmolekül vorhanden sind: Asp (1), Tyr (4), His (6), Pro (7), Phe (8).

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die biologische Wirkung von Angiotensinen und synthetischen Peptiden, bei denen die Aminosäurekette der natürlich vorkommenden Angiotensine verändert ist.

Tabelle 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	Aktivität
Pferd	Asp	Arg	Val	Tyr	Ileu	His	Pro	Phe	1,00
Rind	+	+	+	+	Val	+	+	+	1,00
	AspNH ₂	Lys	+	+	Leu	+	+	+	0,01
	Asp	Orn	+	+	Val	+	+	+	0,20
Synthetische Octapeptide (13, 14, 15, 16)	BAspNH ₂	+	+	+	Val	+	+	+	1,50
	BAspNH ₂	Lys	+	+	Val	+	+	+	0,10
	BAspNH ₂	Val	+	+	Val	+	+	+	0,05
	BAspNH ₂	+	+	+	Leu	+	+	+	0,25
	BAspNH ₂	+	Leu	+	+	+	+	+	1,00
	Gly	+	+	+	Val	+	+	+	0,50
	Asp	L-Arg	+	+	+	+	+	+	0,85
	Asp	D-Arg	+	+	+	+	+	+	0,43
	Gly	L-Arg	+	+	+	+	+	+	0,03
Lys??Asp	?	?		Tyr	?	His	Pro	Phe	0,55

"Pepsitensin"

Die Positionen 2, 3 und 5 könnten durch andere Aminosäuren ersetzt sein, da sie für die pharmakologische Wirkung nicht von so großer Bedeutung sind. Die drei restlichen Aminosäuren könnten als Verlängerung des Aminoendes der Asparaginsäure gedacht werden, da keine aminoendständige Asparaginsäure gefunden wurde.

Das Carboxylende des Peptids könnte als identisch mit Angiotensin II angenommen werden, da beide Peptide in vitro gleich resistent gegen die Peptidasen des Serums (Amino- und Carboxypeptidasen) sind und in vivo praktisch gleich rasch abgebaut werden.

III) Experimenteller Teil

1) Anreicherung und chemische Untersuchungen

Die Aktivität der Präparate wird an Hand von synthetischem Angiotensin II standardisiert und als mg Protein/mg Angiotensinwirkung angegeben.

a) Pepsinverdauung:

50 l Rinderplasma werden durch Zusatz von Perchlorsäure auf eine Säurekonzentration von 6% gebracht. Das gefällt Eiweiß wird abzentrifugiert und nach Suspendieren in Wasser 48 Stunden gegen Leitungswasser dialysiert. Anschließend wird die gesamte Eiweißmenge in 30 l Wasser aufgeschlämmt, das pH mit HCl auf 2,5 eingestellt und bei 37°C. 40 Stunden mit Pepsin (1:1000 auf Protein berechnet) inkubiert. Nach den ersten 20 Stunden wird nochmals die gleiche Menge Pepsin zugegeben.

Beim Zurückstellen des pH auf 6,0 mit NaOH entsteht eine Fällung von wenig angegriffenen Proteinen, welche durch Filtrieren entfernt werden. Das Filtrat wird auf etwa 10 l eingengt. Aktivität: 200 mg Protein = 1 Pepsitensineinheit (1 Pi).

b) Isolierung von Pepsitensin:

1) Fraktionierung an Dowex 1 x 2

Durch einen analytischen Vorversuch am stark basischen Anionenaustauscher Dowex 1 x 2 nach der Methode von G. Braunitzer (8) wird das Peptidgemisch in basische, neutrale und saure Peptide (s. Fig. 1) aufgetrennt.

Die biologische Testung am Blutdruck des Hundes zeigt die blutdrucksenkende Substanz (Pepsitocin) in der basischen Peptidfraktion (D_1), während die blutdrucksteigernde Substanz

(Pepsitensin) in der neutralen Peptidfraktion sich findet. Die sauren Peptidfraktionen enthalten keine pharmakologisch aktiven Substanzen.

Für die Gewinnung größerer Mengen der neutralen Peptidfraktion wurde in das unter a) gewonnene Spaltgemisch 2 kg Dowex 1 x 2 eingerührt, das pH mit NaOH auf 8,4 eingestellt. Nach 30 Minuten werden die basischen Peptide vom Austauscher abfiltriert und mit Collidin-Pyridin-Acetatpuffer nachgewaschen. Die neutralen Peptide wurden aus dem Austauscher mit 0,2n Essigsäure eluiert (3 mal).

Um aus dem Spaltgemisch das gesamte Pepsitensin zu absorbieren, wird der beschriebene Vorgang zweimal wiederholt. Die vereinigten Essigsäureauszüge werden im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 1 l Wasser gelöst und die biologische Aktivität bestimmt. Aktivität 67 mg = 1 Pi.

2) Gelfiltration an Sephadex G 25

Das aktive Peptidgemisch wird in Portionen von 100 ml auf Säulen (Sephadex G 25, Länge 90 cm Durchmesser 8 cm) aufgebracht und mit Wasser eluiert. Das Eluat wird in Gläsern à 10 ml aufgefangen (s. Fig. 2), auf Aktivität getestet, die aktiven Zonen vereinigt, auf 500 ml eingeeengt und noch zweimal an Sephadex G 25 in der gleichen Weise fraktioniert. Das so gewonnene Material wird nochmals wie unter b) an Dowex 1 x 2 fraktioniert. Aktivität: 1 mg = 1 Pi.

3) Fraktionierung an P-Cellulose

Die Trockensubstanz wird in 100 ml Wasser gelöst und auf zwei Säulen (Länge 60 cm, Durchmesser 6 cm) mit P-Cellulose in der H^+ -Form aufgetragen. Die mit Wasser eluierbare Substanz ist inaktiv. Mit 0,1n Ammoniak gelingt die Elution des

aktiven Peptidgemisches (s. Fig. 3). Nach dem Verdampfen wird gefriergetrocknet. Aktivität: $0,5 \text{ mg} = 1 \text{ Pi}$.

4) Papierchromatographie

a) Laufmittel: Collidin/Wasser gesättigt.

30 mg Peptidgemisch werden in schmaler 40 cm langer Zone auf Chromatographierpapier (Schleicher-Schüll Nr. 2043) aufgetragen und 20 Stunden absteigend chromatographiert. Das luftgetrocknete Chromatogramm wird in Zonen à 3 cm aufgeteilt und zonenweise eluiert. Die aktive Substanz wird in Zone 7 gefunden. Zur Darstellung der entsprechenden Zonen werden Randstreifen des Chromatogramms mit Ninhydrin angefärbt. Rechromatographie der aktiven Substanz unter den oben angegebenen Bedingungen mit anschließender Elution der nun einheitlichen Zone. Aktivität: $0,05 \text{ mg} = 1 \text{ Pi}$.

b) Laufmittel: Butanol-Ameisensäure-Wasser im Verhältnis $7,5 : 1,5 : 1$.

Die aus dem letzten Lauf gewonnene Substanz wird wie oben beschrieben auf Chromatographierpapier (Whatman Nr. 1) aufgetragen und 14 Stunden absteigend chromatographiert. Die mit Ninhydrin angefärbten Randstreifen zeigen im wesentlichen 3 Zonen, wobei das aktive Peptid in der Zone 2 lokalisiert ist. Nach Elution und Vakuumverdampfung wird die aktive Fraktion nochmals unter gleichen Bedingungen chromatographiert. Dabei ergibt sich eine einheitliche Zone. Aktivität: $0,0018 \text{ mg} = 1 \text{ Pi}$.

c) Prüfung auf Einheitlichkeit (Endgruppe)

Zunächst wird im Mischchromatogramm mit synthetischen 5-valyl-Angiotensin II das verschiedenartige chromatographische Verhalten der beiden Peptide festgestellt.

Für Endgruppenbestimmung wird nach Sanger verfahren. Das Pep-

tid wird in 0,1% Trimethylaminlösung gelöst und zu der Lösung 10 ul Dinitrofluorbenzol in 0,2 ml Äthanol zugesetzt. Nach zwei Stunden werden einige Tropfen Wasser und 1% Trimethylamin hinzugefügt und dreimal mit Äther extrahiert. Die wäßrige Lösung wird verdampft, in 5 ml 6n HCl gelöst und im Einschlußrohr 24 Stunden bei 105°C. hydrolysiert. Anschließend wird dreimal mit Äther extrahiert und die wäßrige Phase zur Trockne eingedampft. Beide Phasen werden in etwas Aceton gelöst und chromatographisch nach Braunitzer untersucht. In der Ätherphase wurde nur Di-DPN-Lysin gefunden, in der wäßrigen Phase kein DPN-Derivat.

d) Bausteinanalyse des Pepsitensins

2 mg Pepsitensin werden in 5 ml 6n HCl 12 Stunden im Einschlußrohr bei 105°C. hydrolysiert, anschließend die Säure verdampft und das Hydrolysat auf dem automatischen Aminosäureanalysator nach Hannig (11) untersucht.

Die quantitative Auswertung der Analyse ergibt folgende Molekularverhältnisse:

Aminosäuren	Lys	His	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Leu	Tyr	Phe
Mol	1,00	0,97	1,08	1,15	1,00	0,5	1,02	0,82	0,95	1,03	0,99
Zahl d. Reste	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

e) Biologischer Test am Blutdruck des Hundes

Zur biologischen Austestung der pharmakologischen Aktivität der einzelnen Pepsitensinpräparate diente der Carotisblutdruck des narkotisierten Hundes.

Mittelgroße Hunde (10 - 16 kg Körpergewicht) werden mit Morphin/Pernocton narkotisiert und mit Atmosphärenluft durch Trachealsonde künstlich beatmet. Eine A. car. comm. wird end-

ständig unterbunden und über eine Glaskanüle mit einem Quecksilbermanometer verbunden, dessen Druckwerte über einen Schreibhebel auf eine berußte rotierende Trommel übertragen werden. Die zu untersuchenden Substanzen werden durch eine Flügelkanüle in die vena saphena injiziert.

f) Biologischer Test an glattmuskulären Organen

Zur Bestimmung der Kontraktionswirkung von Angiotensin und Pepsitensin an den glatten Muskelfasern von Uterus und Ileum der Ratte bzw. des Meerschweinchens wird das Organ bzw. der Organteil in ein 20 ml Tyrodebad (Uterus) bzw. Jalonbad (Ileum) von 30°C. gebracht, in das die zu untersuchende Substanz in den jeweiligen Konzentrationen eingespritzt wird. Die Verkürzung der Organe in ihrer Längsachse bei Kontraktion wird über einen Schreibhebel auf eine berußte rotierende Trommel aufgezeichnet.

Als Maß für die Kontraktionswirkung wird am Uterus der Umschlagspunkt zwischen den beiden Kontraktionsphasen, die eine Injektion nach sich zieht, gemessen, während am Ileum die absolute Verkürzung des Organteiles maßgebend ist.

2) Pharmakologische Untersuchungen.

Zur pharmakologischen Abgrenzung des Pepsitensins gegenüber Angiotensin II werden Diskriminierungsversuche an den Testobjekten Carotisblutdruck des Hundes, Rattenuterus und Meerschweinchenileum unternommen.

Zunächst wird am Blutdruck des Hundes die einer definierten Angiotensinmenge (z.B. 0,3 µg) wirkungsgleiche Pepsitensinmenge bestimmt, wobei nicht voll angereicherte Produkte verwendet werden. Sodann werden beide Substanzen in den ermittelten Mengen in ihrer Wirkung an der Kontraktion des Ratten-

uterus (Jalonslösung, 30°C.) untersucht. Dabei findet sich bei Pepsitensin eine Wirkung, die nur 20% der des Angiotensins II entspricht.

Die gleichen Untersuchungen am Meerschweinchendarm (Tyrodelösung, 30°C.) ergeben für Pepsitensin nur 25% der Wirkung von Angiotensin II.

3) Abbauversuche.

Die Beständigkeit des Pepsitensins gegen verschiedene proteolytische Fermente wurde in der Weise untersucht, daß man definierte Pepsitensinmengen (nicht voll angereicherte Präparate) mit Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Carboxypeptidase (1:1000) 30 Minuten bei 37°C. inkubierte und die Veränderungen der pharmakologischen Wirkung untersuchte.

Es ergab sich bei Inkubation mit Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidase bereits nach 30 Minuten ein völliges Verschwinden der pharmakologischen Aktivität, während bei Inkubation mit Pepsin ein Aktivitätsabfall auf 50% in der gleichen Zeit eintrat.

Versuche mit Plasma in vitro ergaben bei Inkubation bei 37°C. bis zu 4 Stunden volle Beständigkeit des Pepsitensins.

Zusammenfassung

Wie Untersuchungen von Croxatto ergaben, wird aus stark angesäuertem Plasma durch peptische Hydrolyse eine Substanz freigelegt, deren pharmakologische Wirksamkeit sich am Gefäßsystem von Versuchstieren durch eine periphere Vasokonstriktion und an glattemuskulären Organen bzw. Organteilen durch eine Kontraktionserregung auszeichnet.

Eine chemische und pharmakologische Abgrenzung des mit Pepsitensin bezeichneten Wirkungsprinzips gegen Angiotensin II und

dessen synthetische Analoga ist bisher nicht gelungen.

Durch Ionenaustauscherchromatographie an Dowex 1 x 2 bzw. P-Cellulose, Gelfiltration und Papierchromatographie wurde aus dem peptischen Spaltgemisch von Rinderplasma ein pressorisch wirksames Prinzip isoliert, das sich als Endekapeptid von der Zusammensetzung Lys (His, Asp, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Leu, Tyr, Phe) erwies. An Hand der quantitativen Analyse und der gegen 5-valyl-Angiotensin II standardisierten pharmakologischen Aktivität der Analysenmenge konnte die Aktivität des Pepsitensins ermittelt werden.

Im Vergleich mit Angiotensinanaloga wird auf Grund der pharmakologischen Aktivität und der im Pepsinmolekül vorhandenen Aminosäuren eine Teilkonstitution des Pepsitensins diskutiert.

In Abbaubersuchen wird die Beständigkeit des Pepsitensins gegen proteolytische Fermente wie Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Carboxypeptidase und gegen die Fermente des Serums geprüft.

Mit Hilfe der Bausteinanalyse und Endgruppenbestimmung, welche Lysin als aminoendständigen Rest ergab und Diskriminierungsversuchen an drei verschiedenen Testobjekten (Carotisblutdruck des Hundes, Kontraktion des Rattenuterus und Meer-schweinchenileum) konnte gezeigt werden, daß die Verbindung Pepsitensin mit Rinderangiotensin II nicht identisch ist.

V) Literaturverzeichnis

- 1) Frey, E.K., Kraut, H. und E. Werle: Kallikrein, Stuttgart, Ferdinand Enke 1950.
- 2) Werle, E., Götze, W. und A. Keppler: Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. Biochem. Z. 289, 217 (1937).
- 3) Werle, E. und M. Grunz: Zur Kenntnis der darmkontrahierenden, uteruserregenden und blutdrucksenkenden Substanz DK. Biochem. Z. 301, 429 (1939).
- 4) Roche e Silva, M., Beraldo und G. Rosenfeld: Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. Amer. J. physiol. 156, 261 (1949).
- 5) Elliott, P.F., Lewis, G.P. and E.W. Horton: The structure of bradykinin - a plasma kinin from ox blood. Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 87 (1960).
- 6) Boissonnas, R.A., Guttman S. et P.A. Jaquenoud: Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinin. Helv. chim. Acta 43, 5, 1349 (1960).
- 7) Croxatto, H. in J.H. Gaddum: Polypeptides which stimulate plain muscle. E.u.S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1955, S. 92.
- 8) Rudloff, V. und G. Braunitzer: Hoppe-Seyler's Z. 323, 129 (1961).
- 9) Sanger, F. and E.O.P. Thomson: Biochim. biophys. Acta 9, 225 (1952).
- 10) Stein, W.H. and S. Moore: J. biol. chem. 192, 663 (1951).

- 11) Hannig, K.: Clin. chim. Acta 4, 51 (1959).
- 12) Werle, E., Trautschold, I. und A. Schmal: Hoppe-Seyler's
Z. physiol. Chem. 332, 79 - 87 (1963).
- 13) Schwyzer, R. und H. Turrian: Vitamins and Hormons 18, 237
(1960).
- 14) Schwyzer, R.: Helv. chim. acta 44, 677 (1961).
- 15) Riniker, B. und R. Schwyzer: Helv. chim. acta 44, 677 (1961).
- 16) Schröder, E.: Liebig's Ann. Chem. 680, 132 - 141 (1964).
- 17) Havinga, E., Schattenkerk, G., Heymann-Visser, G. and K.E.T.
Kerling: Requeil des Travaux chimiques Des Pays-Bas T. 83 -
No. 7 - July 1964.

Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. E. Werle,
meinem verehrten Doktorvater,
danke ich für die Überlassung des Themas
und die freundliche Unterstützung während der Arbeit.
Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts,
insbesondere Herrn Dr. K. Hochstraßer,
für ihre stets bereite Hilfe.

Lebenslauf.

Am 1. August 1938 wurde ich in Geislingen/Steige als zweites Kind des Oberlokomotivführers Karl Scheller und seiner Ehefrau Paula Scheller, geb. Stahl geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule von Juli 1945 bis Oktober 1949 wechselte ich auf das Gymnasium Geislingen/Steige über und legte dort im März 1959 die Reifeprüfung ab.

Im April 1959 wurde ich zur Ableistung des Grundwehrdienstes zur 1. Gebirgsdivision nach Mittenwald einberufen. Nach meiner Entlassung als Fahnenjunker d. Res. im April 1960 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München, wo ich nach fünf vorklinischen Semestern das Physikum ablegte. Nach dem Studium der klinischen Semester an der Universität München meldete ich mich im Juli 1965 zur ärztlichen Prüfung die ich im Dezember 1965 mit Erfolg ablegte.

